نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۱۹۴-۱۸۳

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 2, Summer 2020, P. 183-194

مقاله علمی-پژوهشی

ردیابی ژن‌های *Rdg1a* و *mlo* در جو برای مقاومت به بیماری‌های لکه قهوه‌ای نواری و سفیدک پودری

محبوبه خلیلی[1]- امین میرشمسی کاخکی[2*]- رضا اقنوم[3]- علیرضا سیفی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۹

چکیده

بیماری‌های سفیدک پودری (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) و لکه قهوه‌ای نواری (*Pyrenophora graminea*) از جمله بیماری‌های مهم قارچی جو در ایران می‌باشند و شناسایی ارقام مقاوم یکی از اقتصادی‌ترین و کارآمدترین روش‌ها برای کنترل این بیماری‌ها می‌باشد. این تحقیق، با هدف ردیابی الل‌های مقاوم *Rdg1a* و *mlo-11* در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی والد مقاوم RIL-27 با رقم حساس یوسف انجام شد. ابتدا ارزیابی ژنوتیپی با استفاده از نشانگر HVCSG برای الل مقاوم *Rdg1a* انجام گردید و به ترتیب در نمونه‌های مقاوم و حساس قطعاتی به اندازه‌ی ۷۰۵ و ۴۸۰ جفت باز تکثیر شدند همچنین جهت بررسی الل مقاوم *mlo* از نشانگرهای mlo-6 و mlo-10 استفاده شد این نشانگرها قطعاتی به اندازه‌ی ۴۴۰ جفت باز از ژن *mlo* (الل مقاومت) و ۳۸۰ جفت باز از ژن *MLO* (الل حساسیت) را تکثیر کردند. نتیجه‌ی واکنش والدین و جمعیت F_2 در برابر آلودگی به بیمارگر لکه قهوه‌ای نواری نشان داد که شدت بیماری در نمونه‌های مقاوم دارای الل مقاوم *Rdg1a* خیلی پایین است. در بررسی واکنش این نمونه‌ها به بیمارگر سفیدک پودری جو، لاین L94 به دلیل حضور الل مقاومت *mlo-11* فاقد علایم بیماری بود که احتمالاً ناشی از تأثیر این الل در ایجاد مقاومت است. به طور کلی نتایج حاصل از ارزیابی ژنوتیپی به پتانسیل نشانگرهای mlo-6 و mlo-10 برای شناسایی الل مقاومت *mlo-11* در لاین های انتخابی اشاره می‌کند. نشانگر HVCSG از کارایی پایینی برخوردار بود که لازم است با طراحی نشانگر مولکولی مناسب ژنوتیپ‌های مقاوم را شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی: سفیدک پودری، گزینش به کمک نشانگر، لکه قهوه‌ای نواری

مقدمه

بیماری‌های سفیدک پودری و لکه قهوه‌ای نواری از جمله بیماری‌های مهم قارچی جو در ایران هستند که همه ساله خسارت کمی و کیفی به این محصول وارد می‌کنند. بیماری لکه قهوه‌ای نواری جو، یک بیماری بذر زاد و تک چرخه‌ای است که توسط انگل نیمه اجباری *Pyrenophora graminea* Ito & Kurib در بسیاری از مناطق کشت جو ایجاد شده و سبب عقیمی سنبله‌ها، نکروزه شدن برگ‌ها و کاهش شدید عملکرد می‌شود (۵).

بیماری سفیدک پودری یا سفیدک حقیقی جو نیز توسط انگل اجباری *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* در نواحی مرطوب و نیمه خشک جهان ایجاد می‌شود (۱۳). قارچ عامل بیماری سفیدک پودری قادر است با ایجاد پرگنه‌هایی به رنگ سفید تا خاکستری برروی اندام‌های هوایی گیاه باعث کاهش سطح فتوسنتز، افزایش میزان تنفس و تعرق و در نهایت باعث کاهش عملکرد دانه، وزن دانه و پروتئین دانه شود (۱).

استفاده از منابع مقاومت ژنتیکی در مقابل بیماری‌های گیاهی یک روش اقتصادی و سازگار با محیط زیست برای کنترل این بیماری‌ها است (۲۷). در برابر بیماری لکه قهوه‌ای نواری تاکنون دو نوع مقاومت کامل یا نژاد اختصاصی[5] و مقاومت نسبی[6] گزارش شده است. مقاومت اختصاصی ایجاد شده توسط ژن *Rdg* (*Rdg2a* و *Rdg1a*) سطح بالایی از مقاومت را در برابر عامل بیماری لکه

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mirshamsi@um.ac.ir)
۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

DOI: 10.22067/jpp.v34i2.80752

5- Race specific resistance
6- Partial resistance

قهوه‌ای نواری نشان داده است (۶).

منشأ این مقاومت الل *Rdg1a* از گیاه *Hordeum laevigatum* (i.e., *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) بوده و از طریق رقم Vada (گونه *H. spontaneum*) به تعدادی از ارقام جو اروپائی منتقل شده است که مقاومت پایداری را در برابر دو جدایه بیمارگر لکه قهوه‌ای نواری (Dg2-Dg5) در شرایط آلودگی مصنوعی و در مزرعه نشان داده است (۵). این الل توسط تامسون و همکاران (۳۱) حد فاصل نشانگرهای Msu21 و Xris45b برروی بازوی بلند کروموزوم 2H شناسایی شد.

از سال ۱۹۰۷ که بیفن مطالعات مربوط به ژنتیک مقاومت به بیماری سفیدک پودری جو را آغاز کرده است تا کنون بیش از یکصد ژن مقاومت[1] که مقاومت آنها از نوع نژاد- اختصاصی[2] بوده و بر اساس فرضیه ژن- برای- ژن[3] عمل می‌کنند، شناخته شده و در برنامه‌های به نژادی جو بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. اصلاح برای مقاومت به بیماری بر اساس استفاده از منابع ژنی، ساده‌تر و سریعتر از سایر روش هاست. در عین حال استفاده از این نوع مقاومت فقط برای یک دوره زمانی کوتاه، معمولا ۳ تا ۵ ساله، پس از معرفی رقم مقاوم در سطح وسیع، کارایی دارد (۱۲). اغلب ارقام مقاوم به سفیدک پودری جو معمولا در طول چند سال پس از کشت در سطح وسیع به علت ظهور نژادهای فیزیولوژیک جدید در جمعیّت قارچ عامل بیماری بی اثر شده‌اند (۸). ژن مقاومت به سفیدک پودری *mlo*اولین بار در سال ۱۹۴۲ در جهش‌یافته‌های جو که در معرض اشعه ایکس قرار گرفته بودند، کشف شد. از آن زمان تاکنون حدود ۳۲ الل مختلف این ژن (*mlo1-mlo32*) در جو به روش استفاده از مواد القا کننده جهش، شناسایی شده است. علاوه بر آن در اوایل دهه ۱۹۷۰ یک جهش‌یافته طبیعی این ژن دریک توده بومی جو جمع آوری شده از اتیوپی شناسایی گردید (۱۷). مقاومت ژنی ایجاد شده بوسیله این ژن که علیه همه نژادهای فیزیولوژیک شناخته شده سفیدک پودری مقاوم است با وجود استفاده در تعداد زیادی از ارقام تجاری تاکنون پایدار مانده است. در حال حاضر مقاومت *mlo* که از طریق موتاسیون در ارقام جو ایجاد شده است، یکی از مهم‌ترین منابع مقاومت در برابر سفیدک پودری در ارقام جو می باشد (۷). هرمی کردن ژن‌های مقاومت می‌تواند یک راهبرد مناسب برای اصلاح و ایجاد ارقام مقاوم به بیماری سفیدک پودری و لکه قهوه‌ای باشد. بطور کلی این فرایند طولانی و پرهزینه است، ولی با این حال هرمی کردن ژن‌ها، براساس MAS[4] می‌تواند تجمع ژن‌های مؤثر را در داخل یک لاین تسهیل کند (۱۷). تاکنون مطالعات بسیاری در جو انجام شده است که برای گزینش هرکدام از منابع مقاومت نشانگرهای مولکولی را توسعه دادند و سپس از این ژن‌ها جهت ایجاد مقاومت پایدار[5] هرمی در ارقام جو استفاده کردند (۹، ۲۳، ۲۸، ۳۲ و ۳۰). بنابراین با توجه به ضرورت ایجاد ارقام مقاوم و پایدار، این تحقیق با هدف بررسی نشانگرهای مولکولی کارآمد پیوسته با الل‌های مقاومت *Rdg1a* و *mlo-11* به ترتیب برای دو بیماری سفیدک پودری و لکه قهوه‌ای نواری جهت استفاده در MAS اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق، برروی جمعیت F_2 که حاصل از تلاقی لاین RIL-27 (*Rdg1amlo*) به عنوان والد مقاوم (دارای الل‌های مقاومت *Rdg1a ,mlo-11*) با رقم داخلی یوسف (*rdg1aMLO*) بعنوان والد حساس (دارای الل‌های حساسیت *rdg1a ,MLO*) است، انجام شد. لاین RIL27، یکی از ۱۰۳ لاین نوترکیبی[6] است که از تلاقی رقم جو پیشرفته اروپائی Vada و لاین L94 بومی اتیوپی در دانشگاه واخنینگن هلند توسعه یافته است (۲۱). رقم Vada دارای الل مقاومت *Rdg1a* برروی بازوی بلند کروموزوم 2H است (۱۵). همچنین در لاین L94 الل مقاومت *mlo-11* برروی بازوی بلند کروموزوم 4H قرار گرفته است (۲۶). رقم افضل که حساس به بیماری سفیدک پودری است برای تولید اینوکولوم قارچ سفیدک پودری مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی واکنش مقاومتی ارقام و لاین های مورد استفاده در برابر دو بیماری لکه قهوه‌ای نواری و سفیدک پودری به ترتیب از مایه دو جدایه‌ی قارچی بیماری‌زای Pyg-Mashhad-96 و PM-Mashhad-95 که از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شده بود، استفاده شد.

استخراج DNA و ارزیابی ژنوتیپی جمعیت F_2

DNA ژنومی گیاهان مورد بررسی از برگ‌های سالم و غیرآلوده در مرحله دو برگی براساس روش CTAB استخراج شد (۱۰). سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (Thermoscientific (USA)) و بارگذاری روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. از نشانگر، HVCSG که در سال ۲۰۱۰ توسط بایسلی و همکارانش (۵) براساس توالی EST برنج برای شناسایی الل مقاومت *Rdg1a* در جمعیت RIL حاصل از تلاقی Vada×L94 توسعه یافته بود، استفاده شد (جدول ۱). همچنین نشانگرهای mlo-6 و mlo-10 برای شناسایی الل مقلومت *mlo-11* مورد استفاده قرار

1- Resistance gene
2- Race-specific
3- Flor gene -for -gene hypothesis
4- Marker Assisted Selection
5- Durable resistance
6- Recombinant Inbred Line

گرفتند (جدول ۱). این نشانگرها در سال ۲۰۱۰، توسط ریـن اسـتادلر و همکارانش (۲۴) برای بررسی عملکرد الل‌های موتانـت *mlo* اسـتفاده شدند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت تکثیر کننده ژن‌های مقاومت *Rdg1a* و *mlo-11*

Table 1- Sequence of forward and reverse amplification primers of *Rdg1a* and *mlo-11* resistance genes

نشانگر (Marker)	آغازگر رفت (Forward primer) 5´ → 3´	آغازگر برگشت (Reverse primer) 5´ → 3´	طول قطعه (Length) bp
HVCSG	CCTTCTCGACCGTTTATCTTCGT CATG	CTGCAGGGCTGCTTCAATGAGC	705
mlo-6	CATCTACTACTAGCATGTACC	-	380
mlo-10	-	GTCCTGCCACCTAAGTAGCAG	440

جهـت تکثیـر قطعـات ۷۰۵، ۴۴۰ و ۳۸۰ جفـت بـازی توسـط نشانگرهای HVCSG، mlo-6 و mlo-10 واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش با اسـتفاده از بـافر آنـزیم (بـا غلظت نهایی 1X)، ۰/۳۴ پیکومول بر میکرولیتر از هـر آغـازگر بـرای نشانگر HVCSG و ۰/۴ پیکومول بـر میکرولیتـر بـرای نشـانگرهای mlo-6 و mlo-10، یک واحـد از آنـزیم Taq DNA polymerase، غلظت ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، غلظت ۲ میلی‌مولار کلریـد منیـزیم و ۲۵۰–۲۰۰ نانوگرم از DNA نمونه در دستگاه ترموسایکلر انجام شـد. چرخه‌های دمائی واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیـر قطعـات بـه صـورت ذیـل بـودن: چهـار دقیقـه در دمـای ۹۴ درجـه سـانتی‌گـراد (واسرشت اولیه)؛ ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سـانتی گـراد (واسرشـت)، ۳۰ ثانیـه دمـای ۶۰ درجـه سـانتی‌گـراد (اتصـال آغازگرها) و ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (سنتز) و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گـراد بـرای سـنتز نهـایی در نظـر گرفته شد.

بررسی واکنش جمعیت F_2 به بیمارگرها

جهت ارزیابی فنوتیپی، جمعیت F_2 به دو جمعیـت کوچـک بـا ۳۰ نمونـه بـرای ارزیـابی فنـوتیپی در برابـر دو عامـل بیمـاری‌زای *B. graminis* و *P. graminea* تقسیم شدند. آزمون بیماری‌زایی انجـام شد و تعداد نمونه‌های حساس و مقاوم شمارش شدند.

ارزیابی فنوتیپی در برابر قارچ *P. graminea*

جهت ارزیابی علایم بیماری لکه قهوه‌ای نـواری، ۳۰ نمونـه بـذر جمعیت F_2 به همراه ۳ والد Vada، L94 و یوسف با جدایه‌ی قـارچی بیمـاریزای *P. graminea* بـه روش سـاندویچ آلـوده شـدند. ابتـدا نمونه‌های کوچکی از میسیلیوم‌های ایزوله‌ی قـارچ گرفتـه شـد و بـه محـیط کشـت PDA منتقـل گردیـد. پـس از هیجـده روز کـه میسیلیوم‌های قارچ کل پتـری را فراگرفتنـد بـذور اسـتریل والـدین و جمعیت برروی محیط کشت حاوی قارچ قـرار گرفـت و در نهایـت بـا اسکالپل لایه‌ی دیگری از قارچ برروی بذور قرار داده شد و بـه مـدت بیسـت روز در شـرایط تـاریکی در دمـای ۶ درجـه سـانتیگراد بـرای جوانه‌زنی بذور نگهداری شد (۲۱).

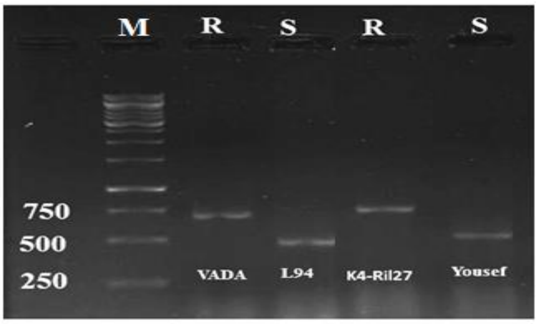
ارزیابی فنوتیپی در برابر قارچ *B. graminis*

جهت ارزیابی علایم بیماری سفیدک پودری، ۳۰ نمونه بـذر F_2 و ۴ والد Vada، L94، RIL-27 و یوسـف در آزمایشـگاه بیوتکنولـوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی کشت شـدند و در مرحله‌ی گیاهچه‌ای مطابق بـا روش اقنـوم و نـیکس (۴) آلـوده شدند.

نتایج و بحث

بررسی و تایید الل مقاومت *Rdg1a*

واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز انجـام شـده در والـدین بـا اسـتفاده از نشانگر HVCSG، قطعاتی با اندازه‌های ۷۰۵ و ۴۸۰ جفـت بـازی را تکثیر نمود. شکل۱ تایید حضور الـل مقاومـت *Rdg1a* را در دو والـد Vada و RIL-27 و عدم حضـور الـل مقاومـت را در دو والـد L94 و یوسف نشان می‌دهد. این نشانگر تنها یک قطعه‌ی ۷۰۵ جفـت بـازی (۴۵۰۰ تـا ۵۲۰۵) از تـوالی کدکننـده‌ی ژن Shalcone synthase را تکثیر می‌کند (۵). نتیجه حاصله در تایید حضور الل مقاومت و اندازه‌ی قطعات تکثیر شده، با آنچه بایسلی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشـان دادند، مطابقت دارد.

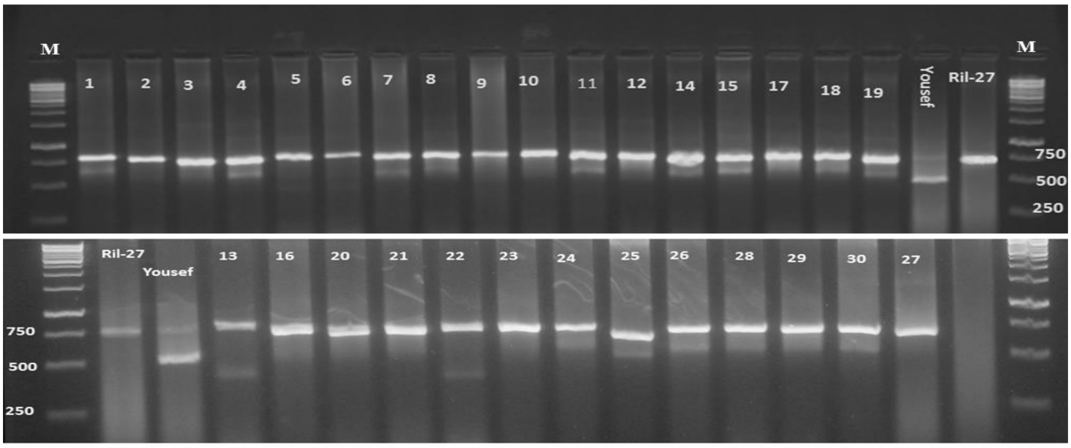


شکل ۱- چندشکلی در نشانگر HVCSG در سه رقم Vada، L94، یوسف و لاین RIL-27 (R-حضور الل مقاومت S-عدم حضور الل مقاومت M- نشانگر استاندارد ۱Kb شرکت فرمنتاز)

Figure 1- The polymorphism of the HVCSG marker in three varieties Vada, L94, Yousef and RIL-27 line (R- Resistance S- Susceptible M- Marker size 1Kb of Fermentas Company)

ارزیابی ژنوتیپی جمعیت F_2 برای حضور الل مقاومت *Rdg1a*

شکل ۲ نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را جهت ارزیابی ژنوتیپی در جمعیت F_2 نشان می‌دهد. نشانگر HVCSG قطعاتی با اندازه‌ی ۷۰۵ جفت باز را در نمونه‌های جمعیت F_2 تکثیر نمود. براساس مطالعات انجام شده، نشانگر HVCSG (ناحیه‌ی تکثیری این نشانگر) می‌تواند در گزینش جمعیت‌های در حال تفرق که در آنها رقم Vada به عنوان والد دهنده‌ی الل مقاومت *Rdg1a* است، و همچنین هدف نقشه یابی الل مقاومت *Rdg1a* است، مورد استفاده قرار بگیرد (۵). اما در این تحقیق نتایج این نشانگر در جمعیت F_2 با آنچه بایسلی و همکارانش (۵) بیان کردند کاملاً مغایرت دارد. نتایج حاصل شده، نشان می‌دهد نشانگر HVCSG از کارایی پایینی برخوردار است.

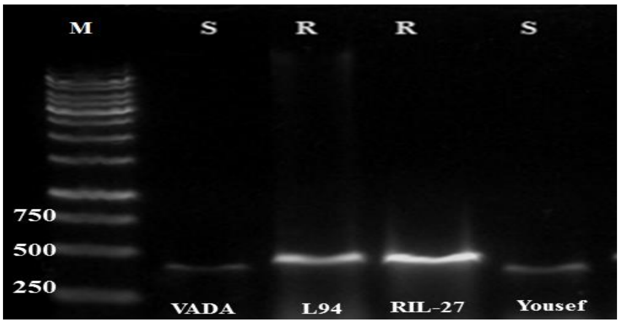


شکل ۲- باندهای تکثیر شده در والدین و جمعیت F_2 توسط نشانگر HVCSG برروی ژل آگارز ٪۲ M- نشانگر استاندارد ۱Kb شرکت فرمنتاز

Figure 2- Amplicated bands in parents and F_2 population by HVCSG marker on agarose gel 2% M- - Marker size 1Kb of Fermentas Company

بررسی و تایید الل مقاومت *mlo-11*

نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی حضور الل مقاومت *mlo-11* در والدین نشان داده شده است (شکل ۳). همانطور که در شکل ۳ مشخص است L94 و RIL-27 والدین مقاوم و دارای قطعه‌ای به طول ۴۴۰ جفت بازی و یوسف و Vada والدین حساس با قطعه‌ای به طول ۳۸۰ جفت بازی هستند. اندازه‌ی قطعات تکثیر شده (۴۴۰ جفت باز از ژن *mlo-11* و۳۸۰ جفت باز از ژن *MLO*) با نتایج رین استادلر و همکاران (۲۴)، که در آن برای بررسی حضور الل *mlo-11* در ارقام بومی از نشانگرهای mlo-6 و mlo-10 استفاده کردند، مطابقت داشت.

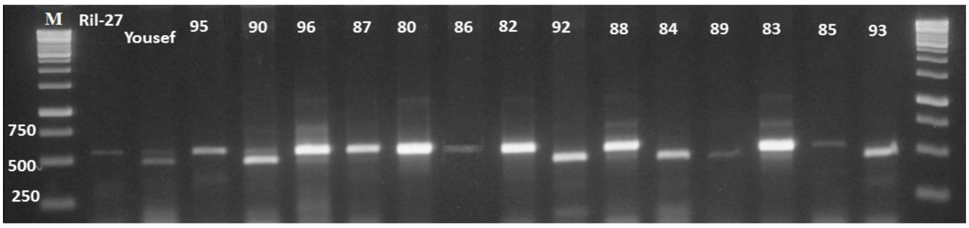


شکل ۳- چند شکلی در نشانگر mlo-6 و mlo-10 در سه رقم Vada، L94، یوسف و لاین RIL-27 (R- حضور الل مقاومتS- عدم حضور الل مقاومت M-نشانگر استاندارد 1Kb شرکت فرمنتاز)

Figure 3- The polymorphism of the mlo-6 and mlo-10 marker in three varieties VADA, L94, Yousef and RIL-27 line (R-Resistance S- Susceptible M- Marker size 1Kb of Fermentas company)

ارزیابی ژنوتیپی جمعیت F_2 برای حضور الل مقاومت *mlo-11*

نتیجه‌ی حاصل از ارزیابی ژنوتیپی جمعیت F_2 در شکل ۴ نشان داده شده است و در آن که نمونه‌های مقاوم دارای قطعات۴۴۰ جفت بازی و نمونه‌های حساس دارای قطعات۳۸۰ جفت بازی هستند.



شکل ٤- باندهای تکثیر شده در والدین و جمعیت F_2 توسط نشانگر mlo-6 و mlo-10 برروی ژل آگارز ۲٪ M- نشانگر استاندارد 1Kb شرکت فرمنتاز (حضور الل مقاومت mlo در نمونه های گیاهی شماره ی ۹۵، ۹٦، ۸۷، ۸۰، ۸٦، ۸۲، ۸۸ و ۸۳ و عدم حضور الل مقاومت در نمونه های گیاهی ۹۲، ۹۳، ۸٤ و ۸۹)

Figure 4- Amplicated bands in parents and F_2 population by mlo-6 and mlo-10 marker on agarose gel 2% M- - Marker size 1Kb of fermentas company (The presence of resistance allele mlo in plant samples with numbers 95, 96, 87, 80, 86, 82, 88, 83 and absence of resistance allele in plant samples with numbers 92, 84, 89, 93)

ارزیابی واکنش مقاومتی والدین و جمعیت F_2 به بیمارگرها

تعداد بوته‌های سالم و آلوده پس از ظهور علایم بیماری شمارش شدند و درصد بیماری بوته‌های آلوده مشخص شد (شکل ۵).

واکنش مقاومتی در برابر قارچ *P. graminea*

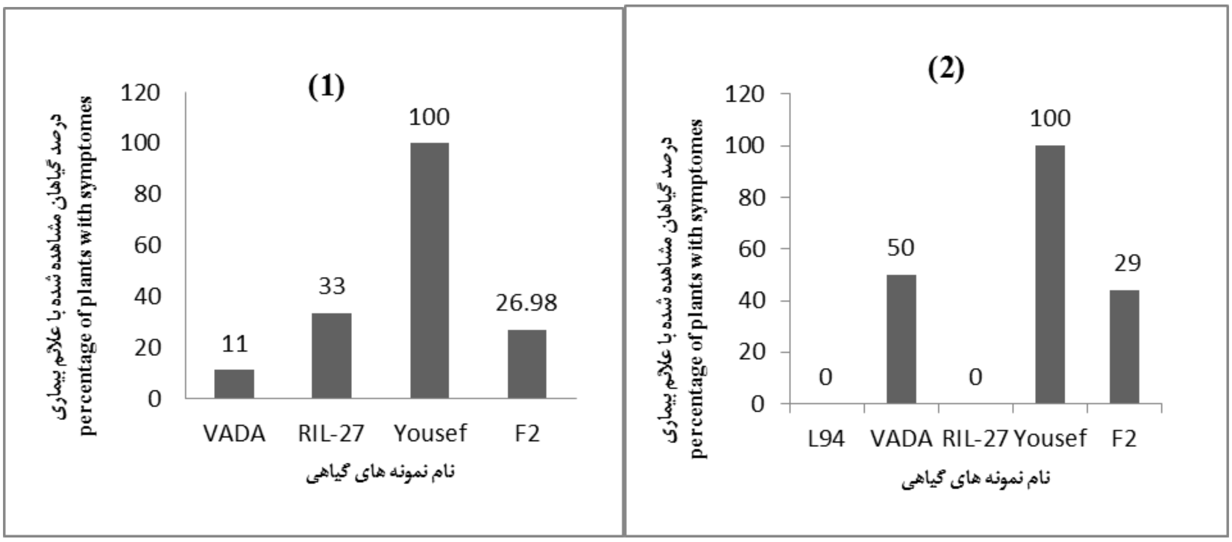
بذرهای جوانه زده‌ی حاصل از آزمون بیماری‌زایی جهت ارزیابی فنوتیپی کشت شدند. آلودگی صد درصدی رقم یوسف به عنوان والد حساس با قارچ *P. graminea* موفقیت آزمون بیماری‌زایی را نشان داد. در سایر نمونه‌ها ۲۴ روز پس از کشت، علایم بیماری لکه قهوه‌ای نواری در مرحله ی پنج برگی پدیدار شد. ابتدا بر روی برگ‌های آلوده یک نوار زرد کمرنگ ظاهر شد و اکثر برگ‌هایی که بعد از آن تشکیل شدند علایم بیماری را نشان دادند. سپس نوارهای زرد رنگ برروی برگ‌های آلوده به حالت نکروتیک درآمده به یکدیگر پیوستند و سبب مرگ برگ شدند (شکل۶).

دو والد مقاوم RIL27 و Vada به دلیل داشتن الل مقاومت *Rdg1a* با درصد خیلی کم علایم بیماری لکه قهوه‌ای نواری را نشان دادند (شکل ۵). در ۳۰ نمونه‌ی جمعیت F_2 (۲۱ نمونه‌ی مقاوم و ۹ نمونه‌ی حساس) جهت تعیین اختلاف بین نتایج مشاهده شده و قابل انتظار در مقابل عامل قارچی *P. graminea* آزمون کای مربع برای تشخیص نسبت (۳:۱) انجام شد. (X^2=۰/۴، P-value>0.05) (جدول ۲). آریو و همکارانش (۲) بیان کردند که Vada به دلیل حضور ژن مقاومت درصد خیلی کمی حدود ٪۷ از علایم بیماری را نشان می دهد. بایسلی و همکارانش (۵) نیز میزان آلودگی والد Vada را به میزان ٪۲ گزارش نمودند.

ارزیابی فنوتیپی در برابر قارچ *B. graminis*

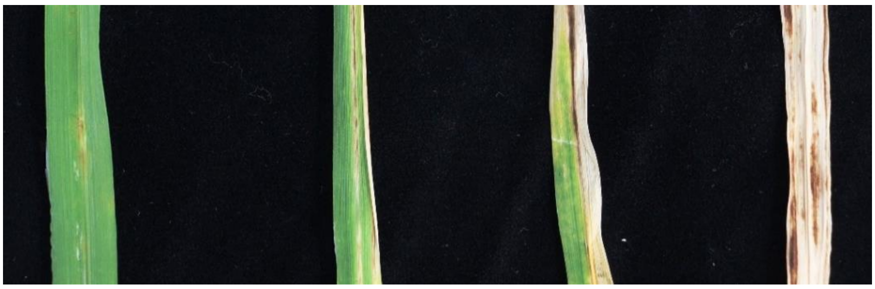
علایم بیماری پس از انجام آزمون بیماری‌زایی با قارچ *B. graminis*، در والد یوسف به صورت نقاط کرکی سفیدرنگ بر روی

سطح برگ مشاهده شد. در رقم Vada به صورت نقاط کرکی سفیدرنگ و نقاط نکروزه مشاهده شد. L94 و RIL-27 که هردو دارای ژن مقاومت *mlo-11* بودند علایمی از بیماری را نشان ندادند (شکل ۸). علایم نکروزه مشاهده شده در والد Vada می‌تواند ناشی از ژن مقاومت *Ml(La)* باشد. ژن *Ml(La)* در سال ۱۹۹۳ توسط گیز و همکارانش (۱۵) برروی کروموزوم ۲ نقشه یابی شد. تامسون و همکارانش (۳۱) در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که این ژن در نزدیکی الل مقاومت *Rdg1a* قرارگرفته است. واکنش این ژن در برابر عامل بیماری سفیدک پودری به صورت اختصاصی است و سبب مرگ سلولی می‌شود. علت ایجاد علایم نکروزه در رقم Vada با نتایج گزارش شده در مطالعات قبلی قابل توجیه است.



شکل ۵- ۱) درصد بیماریزایی با قارچ *P.graminea* در والدین و جمعیت F_2 ۲) درصد بیماری‌زایی با قارچ *B. graminis* در والدین و جمعیت F_2

Figure 5- 1) Percentage of pathogenicity with *P.graminea* fungi in parents and F_2 population 2) percentage of pathogenicity with *B. graminis* in parents and F_2 population



شکل ٦- روند گسترش علایم بیماری لکه قهوه‌ای نواری بر روی یکی از نمونه‌های جمعیت F_2

Figure 6- The process of spreading symptoms of leaf stripe disease on one of the F_2 population



شکل ۷- علایم موجود برروی برگ ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بیماری لکه قهوه‌ای نواری در جمعیت F_2 (۱- ژنوتیپ مقاوم (R) ۲- ژنوتیپ حساس (S))

Figure 7- Symptomes on leaves of resistance and susceptible genotype in F_2 population (1- resistance genotype (R) 2- susceptible genotype (S))



شکل ۸- عدم ظهور علایم بیماری سفیدک پودری در دو رقم L94 و RIL-27 و ظهور علایم کرکی، نکروزه در رقم Vada و علایم کرکی سفیدرنگ در رقم یوسف (R- ژنوتیپ مقاوم S-ژنوتیپ حساس)

Figure 8- The absence of symptoms of powdery mildew disease in two cultivars L94 and RIL-27 and appearance of powdery, necrotic symptoms in Vada and white powdery symptoms in Yousef (R- Resistant genotype S-Susceptible genotype

پس از مشاهده‌ی علایم بیماری، نمونه ها براساس علایم امتیازبندی شدند. سپس در ۳۰ نمونه‌ی جمعیت F_2 (۲۰ نمونه‌ی مقاوم و ۷ نمونه‌ی حساس) جهت تعیین اختلاف بین نتایج مشاهده شده و قابل انتظار در مقابل عامل قارچی *B. graminis* آزمون کای مربع برای تشخیص نسبت (۳:۱) انجام شد. (X^2=۰/۰۱۲، P-value>0.05) (جدول ۲). L94 یک رقم بومی اتیوپی است، با دانه هایی به رنگ سیاه و بدون پوشش که به دلیل دارا بودن الل مقاومت *mlo* به بیماری سفیدک پودری مقاوم است (۲۶).

جمعیت F_2 براساس حضور و عدم حضور الل مقاومت علایم مختلفی نشان دادند. درجمعیت نمونه‌های دارای الل مقاومت علایم کلروزه و نکروزه خفیف داشتند و آنهایی که الل مقاومت را نداشتند علایم نکروزه و کرکی مشاهده شد. در نمونه‌های دارای الل مقاومت *mlo-11* ظهور علایم نکروزه می‌تواند به علت حضور ژن مقاومت *Ml(La)* و همچنین تظاهر متفاوت (اثرات پلیوتروپی)[1] ژن *mlo* باشد. شینچن و همکاران (۳۳) بیان کردند که ژن های *mlo* که در اثر عوامل موتاسیون زا و خودبه خودی ایجاد می‌شوند می تواند تظاهر متفاوتی داشته باشد و همچنین ظهور علایم نکروزه برروی برگ های گیاهان دارای ژن مقاومت *mlo-11* می‌تواند به دلیل اثر همپوشانی ژن *mlo* با سایر QTL ها باشد. اقنوم و همکاران (۳)، لوکوس‌های مسئول صفات کمی مرتبط با مقاومت ایجاد شده در مقابل عامل بیماری سفیدک پودری را نقشه یابی کردند و گزارش کردند که همه ی لاین‌های والدی، به جز L94 که ژن مقاومت *mlo* را حمل می‌کند علایم بیماری را نشان می‌دهند. شاتایا و همکارانش (۲۶) تعدادی از این ناحیه‌های ژنی را در جمعیت RIL حاصل از تلاقی دو والد L94×VADA در برابر دو بیماری سفیدک پودری و سوختگی برگ جو شناسایی کردند و عکس‌العمل هرکدام از والدین را برابر این دو عامل بیماری‌زا در طی دو سال ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ ارزیابی کردند. آنها بیان کردند که رقم L94 علایمی از بیماری سفیدک پودری را به دلیل حضور ژن *mlo* در سال های ۲۰۰۳ و۲۰۰۴ نشان ندادند در حالی که درصد آلودگی رقم Vada در سال ۲۰۰۳، ٪۱۴ و در سال ۲۰۰۴، ٪۴ بود. علاوه براین بیان کردند با وجود داشتن ژن مقاومت *MlLa* امکان ابتلا به بیماری سفیدک پودری در رقم Vada وجود دارد. که نتایج حاصل از ارزیابی فنوتیپی در این تحقیق نیز با نتایج گزارش شده در مطالعات قبلی قابل توجیه است. محققین از نشانگرهای CAPS برای گزینش همزمان ژن‌های مقاومت *Mla* و *Rph7* که به ترتیب باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌های سفیدک پودری و زنگ نواری در جو می‌شدند، استفاده کردند و به اهمیت این نشانگرها در هرمی کردن ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی جو اشاره کردند (۳۰). همچنین نشانگرهای CAPS را برای تمیز دادن الل‌های *rym4* و *rym5* ایجاد کننده‌ی مقاومت در برابر ویروس زرد موزائیک جو در ژن *Hv-eIF4E* توسعه دادند و به این ترتیب به اهمیت توسعه‌ی نشانگرهای مولکولی کارآمد و تأثیر مفید آن بر روی برنامه‌های اصلاح جو اشاره کردند (۲۹). در مطالعه‌ای گزارش کردند

1- Pleiotropy

که MAS می‌تواند در گزینش غیرمستقیم مقاومت جو نسبت به ویروس کوتولگی زرد جو BYDV در برنامه‌ی تلاقی برگشتی موثر باشد. برای نشان دادن این موضوع ژن *Yd2* از طریق دو چرخه تلاقی برگشتی به کمک نشانگر (YLM) به ارقام حساس جو منتقل شد. و به این ترتیب به کاربرد MAS در برنامه‌های تلاقی برگشتی اشاره کردند (۱۶).

جدول ۲- نتیجه ی ارزیابی فنوتیپی برای پاسخ به بیماری‌های سفیدک پودری و لکه قهوه‌ای نواری و ارزیابی ژنوتیپی برای حضور الل‌های *Rdg1a* و *mlo-11*

Table 2- The result of phenotypic evaluation for response to powdery mildew and leaf stripe and genotyping evaluation for the presence of *Rdg1a* and *mlo-11* alleles

نام نمونه F_2 (Sample name F_2)	شاخص بیماری DI (Disease index)	گزینش به کمک نشانگر توسط نشانگر HVCSG (MAS by HVCSG marker)	نام نمونه F_2 (Sample name F_2)	شاخص بیماری DI (Disease index)	گزینش به کمک نشانگر توسط مارکر mlo (MAS by mlo Marker)
1	0	R	70	0	R
2	0	R	71	0	R
3	0	R	72	0	R
4	0	R	73	0	R
5	0	R	74	0	R
6	1	R	75	0	R
7	1	R	76	0	R
8	1	R	77	0	S
9	0	R	78	0	S
10	1	R	79	1	R
11	0	R	80	0	R
12	0	R	81	0	R
13	1	R	82	0	R
14	0	R	83	0	R
15	0	R	84	1	S
16	0	R	85	1	R
17	0	R	86	0	R
18	0	R	87	0	R
19	0	R	88	0	R
20	0	R	89	1	S
21	1	R	90	0	S
22	0	R	91	1	R
23	0	R	92	1	S
24	1	R	93	1	S
25	0	R	94	0	R
26	1	R	95	0	R
27	1	R	96	1	R
28	0	R			
29	0	R			
30	0	R			

امروزه برای شناسایی منابع مقاومت و اصلاح ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزار جدیدی برای افزایش کارایی برنامه های اصلاحی استفاده می‌شود.

از بین نشانگرهای HVCSG، mlo-6 و mlo-10 که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، نشانگرهای mlo-6 و mlo-10 توانستند در بین نمونه های حساس و مقاوم به خوبی تفرق نشان دهند که این نشانگرها را می توان برای شناسایی الل مقاومت و همچنین کوتاه کردن مدت زمان برنامه‌های اصلاحی جو به کار برد. به طور کلی با معرفی نشانگرهای مولکولی کارآمد و شناسایی منابع ژنتیکی متفاوت در برابر بیماری‌های گیاهی و هرمی کردن منابع مقاومت، می‌توان به ارقام مقاوم دسترسی پیدا کرد و از مصرف روز افزون سموم شیمیایی جهت کنترل بیمارگر جلوگیری کرد.

منابع

1- Arru L., Niks R., Lindhout P., Vale G., Francia E., and Pecchioni N. 2002. Genomic regions determining resistance

to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley. Genome 45(3): 460-466.
2- Aghnoum, R., Marcel, T. C., Johrde, A., Pecchioni, N., Schweizer, P., and Niks, R. E. 2010. Basal host resistance of barley to powdery mildew: connecting quantitative trait loci and candidate genes. Molecular Plant-Microbe Interactions 23(1): 91-102.
3- Aghnoum R., and Niks R.E. 2011. Transgressive segregation for very low and high levels of basal resistance to powdery mildew in barley. Journal of plant physiology, 168(1), 45-50.
4- Biselli C., Urso S., Bernardo L., Tondelli A., Tacconi G., Martino V., Grando S., and Valè G. 2010. Identification and mapping of the leaf stripe resistance gene *Rdg1a* in *Hordeum spontaneum*. Theoretical and Applied Genetics 120(6): 1207-1218.
5- Bulgarelli D., Biselli C., Collins N.C., Consonni G., Stanca A.M., Schulze-Lefert P., and Valè G. 2010. The CC-NB-LRR-type *Rdg2a* resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death. PLoS One 5(9): e12599.
6- Baker S., Newton A., and Gurr S. 2000. Cellular characteristics of temporary partial breakdown of mlo-resistance in barley to powdery mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology 56(1): 1-11.
7- Czembor J.H. 2000. Resistance to powdery mildew in populations of barley landraces from Morocco. Genetic Resources and Crop Evolution 47(4): 439-449.
8- Castro A.J., Chen X., Hayes P.M., and Johnston M. 2003. Pyramiding quantitative trait locus (QTL) alleles determining resistance to barley stripe rust. Crop Science 43(2): 651-659.
9- Chen A., Brûlé-Babel A., Baumann U., and Collins N.C. 2009. Structure–function analysis of the barley genome: the gene-rich region of chromosome 2HL. Functional & Integrative Genomics 9(1), 67-79.
10- Doyle J.J., and Dickson E.E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon 715-722.
11- Dreiseitl A., and Bockelman H.E. 2003. Sources of powdery mildew resistance in a wild barley collection. Genetic Resources and Crop Evolution 50(4): 345-350.
12- Dreiseitl A., Dinoor A., and Kosman E. 2006. Virulence and diversity of *Blumeria graminis f. sp. hordei* in Israel and in the Czech Republic. Plant Disease 90(8): 1031-1038.
13- Francia E., Tacconi G., Crosatti C., Barabaschi D., Bulgarelli D., Dall'Aglio E., and Valè G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82(3): 317-342.
14- Giese H., Holm-Jensen A., Jensen H., and Jensen J. 1993. Localization of the Laevigatum powdery mildew resistance gene to barley chromosome 2 by the use of RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 85(6-7): 897-900.
15- Jefferies S., King B., Barr A., Warner P., Logue S., and Langridge P. 2003. "Marker-assisted backcross introgression of the Yd2 gene conferring resistance to barley yellow dwarf virus in barley." Plant Breeding 122(1): 52-56.
16- Jørgensen J.H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. Breeding for disease resistance, Springer 152-141.
17- Jørgensen J.H., and Wolfe M. 1994. Genetics of powdery mildew resistance in barley. Critical Reviews in Plant Sciences 13(1): 97-119.
18- Joshi R.K., and Nayak S. 2010. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. Biotechnology and Molecular Biology Reviews 5(3): 51-60.
19- Kang W.H., Hoang N.H., Yang H.B., Kwon J.K., Jo S.H., Seo J.K., and Kang B.C. 2010. Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). Theoretical and Applied Genetics 120(8): 1587-1596.
20- 1- Kiesling R. 1985. The diseases of barley. Barley: 269-312.
21- Pecchioni, N., Faccioli, P., Toubia-Rahme, H., Valè, G. and Terzi, V. 1996. Quantitative resistance to barley leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) is dominated by one major locus. Theoretical and applied genetics 93(1-2): 97-101.
22- Qi X., Stam P., & Lindhout P. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. Theoretical and Applied Genetics 96(3-4): 376-384.
23- Riedel C., Habeku B.A., Schliephake E., Niks R., Broer I., and Ordon F. 2011. Pyramiding of *Ryd2* and *Ryd3* conferring tolerance to a German isolate of Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. Theoretical and Applied Genetics 123(1): 69.
24- Reinstädler A., Müller J., Czembor J.H., Piffanelli P., and Panstruga R. 2010. Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein. BMC Plant Biology 10(1): 31.
25- Sharma T. 2003. "Molecular diagnosis and application of DNA markers in the management of fungal and bacterial plant diseases." Indian journal of Biotechnology 2(1): 99-109.
26- Shtaya M., Marcel T., Sillero J., Niks R., and Rubiales D. 2006. Identification of QTLs for powdery mildew and scald resistance in barley. Euphytica 151(3): 421-429.
27- Stein N., Prasad M., Scholz U., Thiel T., Zhang H., Wolf M., and Graner A. 2007. A 1,000-loci transcript map of

the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. Theoretical and Applied Genetics, 114(5), 823-839.

28- Scholz M., Ruge-Wehling B., HabekuB A., Schrader O., Pendinen G., Fischer K., and Wehling P. 2009. *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from Hordeumbulbosum into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. Theoretical and Applied Genetics 119(5): 837-849.

29- Sedlacek T., Marik P., and ChrPová J. 2010. Development of CAPS marker for identification of *rym4* and *rym5* alleles conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex in barley. Czech J Genet Plant Breed 46(4): 159-63.

30- Sedláček T., and Stemberková L. 2010. Development of a molecular marker for simultaneous selection of *Rph7* gene and effective *Mla* alleles in barley. Cereal Research Communications 38(2): 175-183.

31- Thomsen S., Jensen H., Jensen J., Skou J., and Jorgensen J.H. 1997. Localization of a resistance gene and identification of sources of resistance to barley leaf stripe. Plant Breeding 116(5): 455-459.

32- Werner K., Friedt W., and Ordon F. 2005. Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). Molecular Breeding 16(1): 45-55.

33- Xintian Ge Deng W., Lee Z.Z., Lopez-Ruiz F.J., Schweizer P., and Ellwood S.R. 2016. Tempered mlo broad-spectrum resistance to barley powdery mildew in an Ethiopian landrace. Scientific Reports 6: 29558.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 2, Summer 2020, P. 183-194

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۱۹۴-۱۸۳

Detection of *Rdg1a* and *mlo* Genes for Resistance to Leaf stripe and Powdery Mildew Diseases in Barley

M. Khalili[1]- A. Mirshamsi Kakhki[2]*- R. Aghnoum[3]- A. Seifi[4]
Received: 09-06-2019
Accepted: 19-07-2020

Introduction: Powdery mildew and Leaf stripe diseases are the most important of barley fungus diseases in Iran. Identification of new genetic resources and breeding for resistance is one of the most economical and adaptive methods for controlling these diseases. Therefore, the aim of this study was an identification effective molecular marker for detection *Rdg1a* and *mlo* resistance alleles for Marker Assisted Selection against two diseases Leaf stripe and powdery mildew.

Materials and Methods: This study was conducted on F_2 population derived from crosses the RIL-27 that has *Rdg1a*, *mlo-11* resistance alleles and Yousef which has susceptible alleles (*rdg1a*, *MLO*). The RIL27 line is one of the lines of the recombinant inbred line population that derived from a cross between the VADA cultivar and the L94 Ethiopian line. 60 samples of F_2 population were divided into two populations of 30 for genotyping and phenotyping against two diseases. We used HVCSG and mlo-6 and mlo-10 markers for the presence detection *Rdg1a* and *mlo-11* respectively. Also Manchuria cultivar, which is susceptible to powdery mildew was used to produce inoculum powdery mildew. Genomic DNA of the plants was extracted from non-infected leaves in a two-leaf stage by using the CTAB method. Then, the quantity and quality of extracting DNA were studied by using (Thermoscientific (USA)) and Agarose gel (1%). The HVCSG, mlo-6 and mlo-10 markers amplified fragments 705, 440 and 380 base pairs respectively. Phenotyping evaluation against *P.graminea* was performed by using the sandwich method and for phenotyping evaluation against *B. graminis* was done using Aghnoum and et al method. And then the percentage of infect plants were counted.

Results and Discussion: In this study at first, HVCSG marker was used to distinguish *Rdg1a* resistance allele in parents and F_2 population. This marker amplified the 705 base pair band that the result obtained was corresponding to what Biselli and et al showed in 2010. Biselli et al. Developed the HVCSG molecular marker to identify the *Rdg1a* resistance allele in the RIL population from the VADA × L94 crosses by rice EST sequence and they said, this marker amplifies the region from 4500 to 5025 sequences encoding the *Shalcone synthase* gene. But in this study, the results of using this marker in the F_2 population are completely inconsistent with what Biselli and et al have stated. The results show that the HVCSG marker has a low efficiency. Second to check and confirm the presence of mlo-11 allele of mlo-6 and mlo-10 markers were used. The size of amplified regions (440 of the *mlo-11* gene and 380 base pairs of the *MLO* gene) was corresponding to the results of Reinstadlr and et al. showed that these markers amplified 380 and 440 base pair fragments. After of inoculation test and the appearance of the symptoms of the diseases the percentage of infect plant for phenotyping against leaf stripe disease was counted. The Yousef cultivar, which was infected with *P. graminea* as a susceptible parent, showed success in the inoculation test. In other samples, 24 days after planting, symptoms of leaf stripe disease appeared in the five leaf stage. First, on the infected leaves, a yellow strip appeared, and most of the leaves that were later formed showed signs of the disease. Then the yellow strips on the leaves infected joined each other and caused the death of the leaf. Two resistant parents, RIL27 and VADA showed very low symptoms of leaf stripe disease. The results of inoculation test in this study was corresponding with studies from Arru and et al (2002) and Biselli and et al (2010). Arru et al showed that VADA was showing very little about 7% of the symptoms disease due to the presence of the resistance gene. Biselli and et al (2010) also reported that the percentage of infections in VADA parent is 2%. For phenotyping evaluation against powdery mildew disease after infecting the seedlings with *B. graminis* fungus, in the Yousef parent, symptoms were observed as white fluffy dots on the leaf surface. In the VADA variety, there were necrotic points. L94 and RIL-27, which had *mlo-11* resistance gene, did not show any symptoms of the disease. L94 is a native Ethiopian cultivar that allele carries mlo resistance, so it is resistant to powdery mildew. The F_2 population showed different signs based on the presence and absence of allele resistance. The samples with resistance allele, there were appeared mildew

1, 2 and 4- M.Sc. Student and Assistant Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: mirshamsi@um.ac.ir)
3- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

cholestasis and necrosis symptoms, and those that did not have resistance alleles were appeared necrotic and fluffy symptoms. In *mlo-11* resistance alleles, the necrotic symptoms can be due to the presence of the Ml (La) resistance gene and also the pleiotropy effects of the molecular gene. Xintian et al reported that the *mlo* genes were not without pleiotropic effects, and necrotic symptoms on leaves of plants with *mlo-11* resistance gene could be due to the effect Overlapping of the mlo gene with other QTLs. Conventional plant breeding methods are based on phenotypic selection of superior genotypes in segregation generation. Phenotyping methods are often costly and time-consuming for specific traits, but Marker Assisted Selection (MAS) is one of the methods developed to prevent of common problems in conventional plant breeding techniques. In some studies, the researchers pointed to use of molecular markers for facilitating of plant breeding programs.

Conclusion: Molecular markers are used as a new tool for increasing the efficiency of breeding programs to identify genetic resources. In addition, shortening the duration of breeding programs and the selection of recessive alleles, the molecular markers helps to facilitate the pyramiding of resistance genes to provide a broad and durable resistance. In general, the development of efficient molecular markers and the identification of different genetic resources against plant diseases and the pyramiding of resistance resources are preventing of the increasing use of chemical pesticides and fertilizers to control the pathogen.

Keywords: Leaf stripe, Marker assisted selection, Powdery mildew